

ФАРМАКОГНОЗИЯ И БОТАНИКА

О.В. Усовик, Гурина Н.С.

РЕГИОНАЛЬНЫЙ МИКСТ-АЛЛЕРГЕН ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ГИПОСЕНСИБИЛИЗАЦИИ БОЛЬНЫХ ПОЛЛИНОЗОМ

Витебский государственный медицинский университет

Данная работа посвящена изучению пыльцы дикорастущих злаков, которая обладает наибольшей аллергенной активностью.

*Для выявления видов дикорастущих злаков, обладающих наиболее выраженными аллергенными свойствами в различных регионах республики Беларусь, была составлена анкета для определения частоты положительных реакций с пыльцевыми аллергенами с помощью провокационных скарификационных тестов. Все исследования проводили со смесью пыльцы злаков (timoфеевка, ежа, лисохвост). Микроскопические исследования нативной пыльцы проводили в глицерине и спирто-глицериновой смеси на микроскопе МБР-1 при увеличении 40*15 (глицерин-желатин) и на микроскопе МБР-15 при увеличении 90*15 (иммерсия). Определено наличие в качестве примеси к нормально развитым пыльцевым зернам морфологически измененных пыльцевых зерен timoфеевки, ежи сборной и лисохвоста, собранных в п. Улановичи Витебской области, которые составляют до 22 % всей пыльцы.*

Проведены качественные реакции на следующие группы биологически активных веществ: флавоноиды, кумарины, сапонины, алкалоиды, дубильные вещества, антраценпроизводные. Ярко выраженные реакции были получены на флавоноиды, кумарины, дубильные вещества.

Определена влажность пыльцы злаков согласно методике ГФ XI, вып. 1, стр.285 «Определение влажности ЛРС». Кроме того, разработана методика определения влажности пыльцы при комнатной температуре, позволяющая полностью исключить инактивацию при повышенных температурах белков, которые являются аллергенами. Полученные данные сопоставимы. Определена зола в пыльце злаков согласно методике ГФ XI, вып. 2, стр. 24 «Определение золы в ЛРС». Определено содержание белкового азота с помощью метода Бредфорда в пыльце злаков (timoфеевка, ежа, лисохвост 1:1:1), проведен перерасчет в PNU и установлена высокая степень аллергенной активности исследуемой пыльцы (до 25 300 PNU).

Рост распространенности аллергических заболеваний (более 20 % населения планеты) превратили проблему аллергии в глобальную медико-социальную проблему. Ежегодно наблюдается рост количества аллергопатологии, регистрируемый повсеместно (до 40 % больных аллергией в популяции, каждый третий житель планеты страдает аллергическим ринитом и каждый десятый - бронхиальной астмой). Как показали исследования за последние 30 лет, распространенность аллергических заболеваний повсеместно каждые 10 лет удваивается. По данным ВОЗ, в настоящее время около 5% взрослого населения планеты и 15% детского страдают аллергическими заболеваниями [2,3,4].

Работа посвящена изучению пыльцы дикорастущих злаков, которая обладает наибольшей аллергенной активностью. Возможно, высокая аллергенная активность пыльцы злаков объясняется длительностью ее поступления в воздух в больших количествах, неоднократно цветения и расположением соцветий в верхней части растения, выше вегетативных ор-

ганов, что как нельзя лучше способствует рассеиванию пыльцы в воздухе. Кроме того, злаки обладают высокой пылевой продуктивностью. Например, в одном волосе ежи насчитывается до 5 млн. пылевых зерен.

Целью данной работы явилось фармакогностическое изучение пыльцы злаков для разработки показателей подлинности и доброкачественности ее как сырья для получения лечебных и диагностических аллергенов.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- 1) разработать показатели подлинности сырья:
 - определить макроскопические признаки смеси пыльцы,
 - определить микроскопические признаки смеси пыльцы,
 - провести качественное определение основных компонентов химического состава смеси пыльцы;
- 2) Установить критерии доброкачественности сырья:
 - Определить показатели влажности,
 - Определить содержание золы в сырье,
 - Провести стандартизацию сырья по содержанию белкового азота.

В Беларуси высокая концентрация пылевых зерен злаков наблюдается с середины мая до середины августа, лишь в начале сентября их количество заметно уменьшается. В Беларуси встречается около 120 видов злаков. В таблице №1 указаны данные встречаемости пыльцы сем. Poaceae по регионам. В естественных фитоценозах наиболее распространены овсяница красная - *Festula rubra*, овсяница луговая – *Festula pratensis* Huds, мятлик луковичный – *Poa bulbosa* L., мятлик луговой - *Poa platensis* L., мятлик однолетний – *Poa annua* L., ежа сборная – *Dactilis glomerata* L., костер безостный *Bromus inermis* –Leyss., костер полевой - *Bromus arvensis* L., райграсс высокий – *Arrhenatherum elatius* L., тимopheевка луговая – *Phleum pratense* L., лисохвост луговой - *Alopecurus pratensis* L. Доля злаков в растительном покрове республики увеличивается в результате хозяйственной деятельности человека, особенно количество овсяницы луговой – *Festula pratensis*, ежи сборной – *Dactilis glomerata*, тимopheевки луговой – *Phleum pratense*, а также райграсса высокого - *Arrhenatherum platensis*, используемых в качестве газонных трав.

Таблица 1

Содержание пыльцы сем. Poaceae (Злаковые) в воздухе РБ в % от общего количества

Наимен. таксонов пыльцы	Витебск	Минск	Могилев	Гродно	Брест	Гомель	Средн. значение
Poaceae gen.sp.	25,62	26,01	17,63	14,77	20,62	18,75	20,57

С целью выявления видов дикорастущих злаков, обладающих наиболее выраженными аллергенными свойствами в различных регионах республики Беларусь, мы составили анкету для определения частоты положительных реакций с пылевыми аллергенами с помощью провокационных скарификационных тестов. От аллергологических кабинетов областных центров получили данные:

1) О частоте встречаемости аллергических реакций на пыльцу злаков (см. таблица № 2)

Таблица 2

% встречаемости аллергических реакций на пыльцу злаков в областях РБ

Брест, Брестская область	Витебск, Витебская область	Гомель, Гомельская область	Гродно, Гродненская область	Минск	Могилев, Могилевская область
66,5 %	62,06 %	68,3%	62%	65,7%	49,5 %

- 2) В среднем у 50 % больных поллинозом наблюдали поливалентную сенсibilизацию к смеси деревьев, злаков и сорняков (В Витебске и Витебской области у 55 %.)
3) Практически отсутствовала сенсibilизация к какому-либо одному виду пыльцы.

Наиболее часто встречалась повышенная аллергическая реакция на пыльцу тимopheевки (76,5%), овсяницы (67,5%), ежи (74%), лисохвоста (41,5%), костра (69%), мятлика (65%), райграса (58,5%), ржи (44,5%). Причем, установили с помощью тестов преципитации в агаре и геле, что пыльца тимopheевки может давать перекрестные реакции с пылью райграса, овсяницы, мятлика [1,6]. Не обнаружили достоверные различия между экстрактами пыльцы ежи сборной, мятлика, тимopheевки, ржи [7]. Частота встречаемости положительных реакций и выше перечисленные данные позволили разработать пропись микст-аллергена следующего состава - пыльца тимopheевки, ежи, лисохвоста в равных соотношениях.

Со смесью пыльцы проводили следующие исследования.

МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ПЫЛЬЦЫ

Смесь пыльцы представляет собой желтый, легко сыпучий пылевидный порошок без вкуса и запаха.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ нативной пыльцы проводили в глицерине и спирто-глицериновой смеси на микроскопе МБР-1 при увеличении 40*15 (глицерин-желатин) и на микроскопе МБР-15 при увеличении 90*15 (иммерсия).

Пыльца разных злаков Семейства Poaceae сходна между собой по строению. Пыльцевые зерна сфероидальные или слегка вытянутые по одной из осей, в проекции они имеют округлые или овальные очертания. Экзина двухслойная, тонкая. Поверхность экзины имеет слабо выраженную сетчатую или зернистую структуру, улавливаемую только при большом увеличении микроскопа. Поровое отверстие круглое или овальное, окружено «валиком», образованным приподнятой экзиной. Размеры зерен варьируют от 20 до 30 мкм (см. фото 1).

Тимopheевка луговая – пыльцевые зерна однопоровые, сферические или эллиптические, слегка вытянутые: полярная ось 28 мкм, экваториальный диаметр – 23 мкм, поровое отверстие округлое или овальное, имеет 5 мкм в диаметре, окружено «валиком», экзина тонкая, мелкозернистая.

Пыльца отдельных родов злаковых трав (тимopheевка, овсяница, мятлик) чрезвычайно мало отличается морфологически, поэтому ее определение представляет весьма большие трудности даже для специалиста [1]. Однообразие морфологического строения пыльцы злаков затрудняет видовую диагностику и дифференциальный подход к использованию пыльцевых аллергенов, хотя этот недостаток сглаживается перекрестной реактивностью пыльцы злаков (В.С. Martin с соавторами, 1985).

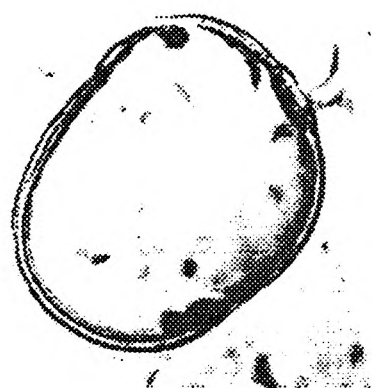
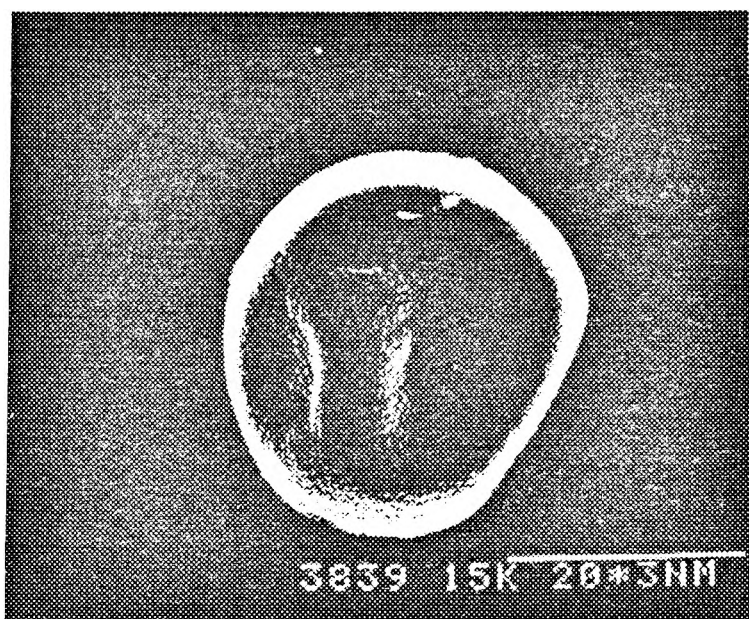


Фото 1. Пыльцевое зерно *Poa sp.*

Ученые государственного университета Аризоны проводили исследования не только на экстрактах пыльцы, но и экстрактах пыльников. Получили данные, что в реакциях иммуно-диффузии имеется полная антигенная общность экстрактов пыльцы и экстрактов пыльников. С учетом этого факта предложили использовать пыльники при сборе и экстракции аллергенов [1], тем более, что сбор пыльцы злаков весьма сложен.

Мы проводили исследования наличия в качестве примеси к нормально развитым пыльцевым зернам морфологически измененных пыльцевых зерен тимopheевки и ежи сборной, собранных в п. Улановичи Витебской области (таблица № 3). В рассмотренной пыльце выделили три разновидности морфологических изменений: 1- загрязненные пыльцевые зерна (п.з.) с четко заметными на поверхности чужеродными частицами, 2 - разорванные п.з. с трещинами, оторванными частями, разрывами экзины или апертур, 3 – деформированные – недоразвитые или сросшиеся п.з., имеющие структуры, не свойственные данному виду пыльцы (выросты различной величины и формы)

Таблица 3

Соотношение нормальных, загрязненных, разорванных и деформированных пыльцевых зерен в пыльце злаков

Вид пыльцевых зерен	Тимофеевка	Ежа	Лисохвост
Нормальные п.з.	82,91%	78, 56%	80,64%
Загрязненные п.з.	13,98%	14, 67%	13,63%
Разорванные п.з.	1,89%	3,32%	2,56%
Деформированные п.з.	1,22%	3,45%	3,17%

Так как в связи с загрязнением окружающей среды, пыльцевые зерна, находящиеся в воздухе, адсорбируют на своей поверхности различного рода поллютанты, это способствует образованию не свойственных пыльце аллергенных комплексов и возникновению непредвиденных аллергических реакций, а также появлению в воздухе деформированных пыльцевых зерен, обладающих повышенной аллергенной активностью (Н.С. Гурина, 1994). После микроскопического изучения пыльцы растений выявили, что существует взаимосвязь между толщиной экзины и степенью поврежденности пыльцевых зерен. В частности, сильному повреждению подвергается пыльца ежи сборной – *Dactylis glomerata*, имеющая тонкую экзину

(1,4 – 1,6 мкм), более устойчива пыльца березы – *Betula* sp. (2,7-3,7 мкм) (В.Н. Кобзарь, 1996 г.).

Поскольку основные пыльцевые аллергены локализованы в спородерме, изменение ее структуры обязательно скажется на аллергенной активности, усиливая последнюю.

ОБНАРУЖЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (БАВ)

Для обнаружения БАВ использовали смесь пыльцы ежи сборной, тимофеевки луговой, лисохвоста в соотношении 1:1:1.

Проводили качественные реакции на следующие группы биологически активных веществ - флавоноиды, кумарины, сапонины, алкалоиды, дубильные вещества, антраценпроизводные. Ярко выраженные реакции были получены на флавоноиды, кумарины, дубильные вещества.

Для определения наличия флавоноидов в пыльце злаков брали по 0,25 г смеси пыльцы (timoфеевки, ежи, лисохвоста). Помещали в пробирку и заливали 2,5 мл 70 % спирта (1:10), настаивали 24 часа, профильтровывали и проводили химические реакции, разработанные для определения флавоноидов в ЛРС [5].

Для обнаружения флавоноидов проводили следующие реакции:

- Реакцию окрашивания - цианидиновую пробу – наблюдали красно-розовое окрашивание во всех опытах,
- реакцию с раствором едкой щелочи – наблюдали желтое окрашивание,
- реакцию комплексообразования с хлоридом алюминия - наблюдали желтое окрашивание, флюоресцирующее в УФ-свете,
- реакцию осаждения раствором основного ацетата свинца – наблюдали появление желтого осадка.

Результаты данных реакций подтвердили наличие флавоноидов в пыльце смеси злаков.

Наличие флавоноидов подтвердили проведением хроматографических исследований. Для проведения двумерной бумажной хроматографии брали извлечение из смеси пыльцы злаков (timoфеевка, ежа, лисохвост 1:1:1), приготовленное для определения наличия флавоноидов и с помощью мерного капилляра наносили 0,1 мл извлечения на хроматографическую бумагу, которую помещали в хроматографическую камеру с 1 системой, содержащей:

- изопропанол – 2 части,
- муравьиную кислоту – 5 частей,
- воду – 5 частей,

После разгона в первом направлении хроматограмму высушивали под тягой, а затем помещали в направлении, перпендикулярном тому, в котором хроматограмма была в первой системе, в хроматографическую камеру со 2 системой, содержащей:

- бутанол – 4 части,
- уксусную кислоту – 1 часть,
- воду – 2 части.

После высушивания хроматограммы рассматривали при дневном и УФ-свете. Без обработки хлоридом алюминия наблюдали ярко-коричневые пятна, после обработки хлоридом алюминия наблюдали усиление флюоресценции, что указывало на возможное присутствие флавоноидов.

Также проводили исследования с помощью одномерной хроматографии в следующих системах:

- 15 % уксусная кислота,
- бутанол (4 части): уксусная кислота(1 часть): вода (5 частей),
- 60% уксусная кислота,
- изопропанол – 2 части :муравьиная кислота – 5 частей: вода – 5 частей.

После высушивания под тягой и изучения при дневном и УФ-свете обнаружили пятна ярко-коричневого цвета, указывающие на возможное присутствие флавоноидов.

Проводили реакции на кумарины с тем же спиртовым извлечением, что готовили для определения флавоноидов - лактонная проба и диазореакция. При проведении лактонной пробы наблюдали появление хлопьевидного осадка, характерного для наличия кумаринов, и вишневое окрашивание при проведении диазореакции.[5]

Наличие дубильных веществ доказали проведением реакций с водным извлечением из пыльцы злаков по реакции осаждения с раствором основного ацетата свинца (появление белого осадка). При проведении реакции с 1% раствором железоммонийных квасцов получили черно-зеленое окрашивание, указывающее, что дубильные вещества относятся к группе конденсированных[5].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАЖНОСТИ ПЫЛЬЦЫ ЗЛАКОВ СОГЛАСНО МЕТОДИКЕ ГФ XI Т. I СТР.285 «Определение влажности ЛРС». Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4

Содержание влаги в пыльце злаков, определенный по методике ГФ XI

Наименование Пыльцы	Ежа	Тимофеевка	Лисохвост
Влажность в %			
Опыт 1	3, 66 %	3, 81 %	3, 56 %
Опыт 2	3, 72 %	3, 83 %	3, 63 %
Опыт 3	3, 69 %	3, 75 %	3, 61 %
Опыт 4	3, 75 %	3, 87 %	3, 58 %
Среднее значение	3,71 % \pm 0, 05	3, 81 % \pm 0, 06	3, 60 % \pm 0, 04

Нами разработана методика определения влажности пыльцы при комнатной температуре, позволяющая полностью исключить иннактивацию при повышенных температурах белков, которые являются аллергенами. *Описание методики:* на аналитических весах отweighивали навеску массой 3 грамма с погрешностью $\pm 0, 0005$, помещали на бумагу, не впитывающую влагу (рентгеновскую пленку) и оставляли в сухом месте при комнатной температуре. Высушивали до постоянной массы. Перед взвешиванием помещали пыльцу в предварительно высушенный и взвешенный бюкс без крышки, ставили в эксикатор на 1 час с сорбентом (безводный CaCl_2). Влажность определяли по формуле ГФ XI:

$$(\text{влажность}) = (m - m_1) \cdot 100 / m_1,$$

где

m – масса навески до высушивания, m₁ - масса навески после высушивания.

Результаты определения влажности пыльцы при комнатной температуре представлены в таблице 5.

Таблица 5

Содержание влаги в пыльце злаков, определенной при комнатной температуре

Наименование пыльцы	Ежа	Тимофеевка	Лисохвост
Влажность в %			
Опыт 1	3, 68 %	3, 78 %	3, 58 %
Опыт 2	3, 64 %	3, 81 %	3, 61 %
Опыт 3	3, 73 %	3, 85 %	3, 52 %
Опыт 4	3, 71 %	3, 76 %	3, 56 %
Среднее значение	3,69 % \pm 0, 05	3, 80% \pm 0, 05	3, 57 % \pm 0, 04

Данные, полученные обеими методиками, показали достоверно сопоставимые результаты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛЫ В ПЫЛЬЦЕ ЗЛАКОВ СОГЛАСНО МЕТОДИКЕ ГФ XI вып. 2, Стр. 24 «Определение золы в ЛРС». Результаты определения золы в пыльце представлены в таблице 6.

Таблица 6

Среднее значение содержания золы в пыльце злаков

Наименование пыльцы	Ежа	Тимофеевка	Лисохвост
Среднее значение содержания золы, в %	3,98 %	3,67 %	3,86 %
Среднее значение содержания золы, нерастворимой в HCL, в %	0,06 %	0,03 %	0,07 %

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВОГО АЗОТА

Содержание белкового азота определяли с помощью метода Бредфорда в смеси пыльцы злаков (timoфеевка, ежа, лисохвост 1:1:1). В основе метода Бредфорда лежит способность красителя Кумасси G-250 связываться с белками и при этом изменять свой спектр поглощения в видимой области: максимум поглощения смещается с 465 нм до 595 нм. Измерение оптической плотности при 595 нм позволило определить концентрацию белка в образце.

К 0,1 мл экстракта добавляли 5 мл (0,01 % водной раствор Кумасси G – 250, содержащий 4,7 % этанола и 8,5 % ортофосфорной кислоты) и измеряли оптическую плотность. Концентрацию белка определяли по предварительно построенной кривой (по бычьему лиофилизированному альбумину). На основании статистической обработки данных построили уравнение для определения концентрации белка. Рассчитывали по формуле содержание белка и белкового азота и переводили в PNU. Содержание белкового азота в смеси пыльцы злаков составило от 2,31 до 2,53 мкг, что соответствует 23 100 - 25 300 PNU.

ВЫВОДЫ

Фармацевтический анализ смеси пыльцы злаков, состоящей из равных частей пыльцы timoфеевки, ежи, лисохвоста позволил установить следующие показатели подлинности и доброкачественности сырья:

1. Сырье представляет собой желтый, сыпучий, пылеобразный порошок без запаха.
2. При микроскопической диагностике наряду с видоспецифическими признаками пыльцы указанных растений следует учитывать морфологически измененные пылевые зерна, составляющие до 22 % всей пыльцы.
3. Сушку свежесобранной пыльцы целесообразно проводить при комнатной температуре для сохранения основных аллергенных белков до значения влажности не более 4 %.
4. Содержание золы общей в смеси пыльцы – не более 4%. Золы, не растворимой в растворе хлористоводородной кислоты – не более 0,07 %.
5. Качественными реакциями установлено наличие в смеси пыльцы флавоноидов, кумаринов, дубильных веществ.
6. Содержание белкового азота в смеси пыльцы злаков составляет 23 100 - 25 300 PNU, что указывает на высокую степень аллергенной активности исследуемой пыльцы (стандартный показатель – 10 000 PNU).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Астафьева Н.Г., Адо В.А., Горячкина Л.А. // «Растения и аллергия». - Издательство Саратовского университета, 1986. - т. 1, С. 79. - т.2, С. 86.
2. Гушин И.С., Ильина Н.И., Польнер С.А. Аллергический ринит: Пособие для врачей // ГНЦ – Институт иммунологии МЗ РФ, РААКИ. - М., 2002. - 68 с.
3. Ильина Н.И. Аллергопатология в разных регионах России по результатам клинко-эпидемиологических исследований // Автореф. докт. дисс. - М., 1996. - 24 с.
4. Клиническая аллергология. Руководство для практических врачей, Под редакцией акад. РАМН, проф., Хаитова Р.М. // М., - «Медпресс-информ». - 2002. - 623 с.
5. М.М. Коноплева «Фармакогнозия: природные биологически активные вещества». - Витебск, 2002. С.119-147.
6. Сидоренко Е.И. Клиническая аллергология. - Киев: Здоровья. - 1991. - С. 78.
7. Voorhorst R., van der Hooft – van Asbeck M.C. Atopic skin test re-evaluated. IX Identity of pollen extracts of four grass species. – Ann. Allergy. 1981, vol. 47. P. 182-185.

55 SUMMARY

Usovik O.V., Gurina N.S.

THE REGIONAL MIXT-ALLERGEN FOR DIAGNOSTICS AND SPECIFIC IMMUNOTHERAPY OF PATIENTS WITH POLLINOSIS.

This work is dedicated to the study of the wild-grasses pollen which has the highest allergenic activity. The target of this work was pharmacognostic study of the grasses pollen to develop the sound weed identity index as a raw material to obtain medical and diagnostic allergens. For revelation of the wild herbs sorts having the highest allergenic properties in various regions of the Republic of Belarus there was composed a form for detection of the positive reactions frequency with pollen allergens using the provocation scarification test. All studies were conducted with a blend of grass (*phleum platense*, *dactylic glomerata*, *alopecurus platensis*) pollen. The microexamination of the native pollen were made in glycerin and a blend of glycerin and alcohol using the microscope МБР1 with multiplying effect of 40*15 (glycerin-gelatin) and the microscope МБР15 with multiplying effect of 90*15 (immersion). There was obtained a presence of the morphologically modified pollen weeds of the *phleum platense*, *dactylic glomerata*, *alopecurus platensis* as a blend to the normally developed pollen weeds collected in the urban settlement Ulanovitchy, Vitebsk region, which constituted up to 22% of the whole pollen. There were conducted the qualitative reactions to the following groups of the biologically active agents: flavonoids, coumarins, saponins, alcoloids, tannings materials, antracene derivatives. There were obtained the most vivid reactions to: flavonoids, coumarins, tannings materials. According to the methods mentioned in the SP XI, volume 1, page 285 "The determination of the Medical Vegetative Raw Material humidity" there was determined the grass pollen humidity. Besides we have worked out the methods of the pollen humidity determination at room temperature, allowing to entirely exclude the inactivation at higher temperature of albumens, which are allergens. The obtained data are comparative. According to the methods mentioned in the SP XI, volume 2, page 24 "The determination of the Ashes in Medical Vegetative Raw Material " there was determined the ashes in the pollen. Using the Bradford method there was determined the IUcontent of the albumen nitrogen in the pollen (*phleum platense*, *dactylic glomerata*, *alopecurus platensis* 1:1:1), conducted recalculation in to the PNU) and established the high rate of allergenic activity of the studied pollen (up to 25 300 PNU).